

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08937

研究課題名(和文) 頭蓋咽頭腫における病理学的サブタイプと糖代謝に関する検討

研究課題名(英文) A study of pathological subtypes and glucose metabolism in craniopharyngioma

研究代表者

登坂 雅彦 (Tosaka, Masahiko)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40323357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍の一種、頭蓋咽頭腫はエナメル上皮腫型と乳頭型という2種類の亜型に分類されます。この内、乳頭型はBRAF遺伝子の変異が発生原因であることが近年報告されました。私たちは、以前の研究で、乳頭型だけに腫瘍内の糖の代謝が亢進していることを疑っていました。頭蓋咽頭腫の組織標本を用いて、糖代謝関連蛋白の発現亢進が見られるのか否か、そしてそれが、BRAF遺伝子変異と、またFDG-PET(糖代謝を画像化する検査)の糖代謝亢進と一致するののかについて研究しました。この結果、頭蓋咽頭腫の内、乳頭型にだけ、BRAF変異、糖代謝関連蛋白の発現亢進、FDG-PETでの糖代謝の亢進がみられることを初めて証明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋咽頭腫は稀ながら頭蓋底部に存在し再発を繰り返す治療困難な脳腫瘍の一種です。この腫瘍の二つのサブタイプ(エナメル上皮腫型と乳頭型)の内、乳頭型だけはBRAF遺伝子の変異が原因であることが報告され、BRAF阻害剤という化学療法薬が、腫瘍を縮小させるとの報告がなされました。私たちの研究により、開頭手術を行うことなしにこの二つのサブタイプについて正確に診断することができれば、化学療法薬の治療効果を事前に予想することが可能となり、将来、適切な化学療法を行うことが可能になります。

研究成果の概要(英文)：Craniopharyngioma, a type of brain tumor, is classified into two subtypes, the adamantinomatous type and the papillary type. Of these, it has recently been reported that the papillary type is caused by mutations in the BRAF gene. In a previous study, we suspected that only the papillary type had increased metabolism of glucose in the tumor. We used tissue specimens of craniopharyngioma to investigate whether upregulation of glucose metabolism-related proteins was observed. We then investigated whether it was consistent with BRAF mutations and increased glucose metabolism in FDG-PET (a test that images glucose metabolism). As a result, it was proved for the first time that BRAF mutation, increased expression of glucose metabolism-related protein, and increased glucose metabolism in FDG-PET were observed only in the papillary type of craniopharyngioma.

研究分野：間脳下垂体腫瘍

キーワード：頭蓋咽頭腫 エナメル上皮腫型 乳頭型 糖代謝 GLUT-1 Hexokinase-2 FDG-PET

1. 研究の背景

- (1) 頭蓋咽頭腫は、典型的な鞍上部腫瘍の一つで、全摘出が難しく、良性でありながら、再発を繰り返す治療困難な腫瘍である。腫瘍は頭蓋底、脳の最深部に発生する為、脳神経外科的に摘出術が非常に困難である。従って手術は部分摘出術に終わることが多いが、腫瘍は良性の性質ながら、必ず再発をきたす。脳深部の手術を繰り返すことで、視力視野障害、ホルモン異常、記憶障害など重篤な障害に加え、致命的な脳損傷も起こりうる困難な腫瘍である。
- (2) 頭蓋咽頭腫は、2つの臨床病理学的な亜型に分類されるエナメル上皮腫型と乳頭型に分類される。エナメル上皮腫型は嚢胞形成を伴う分葉状の腫瘍で、嚢胞内に機械油様の濃褐色調内容液を入れている。乳頭型は成人に発生する充実性腫瘍であり、嚢胞を伴っていることもあるが、機械油様の液体や石灰化はみられない。
- (3) 最近、BRAF, serine-threonine protein kinase がん遺伝子の V600E 変異が乳頭型に特異的に存在することが報告され、この遺伝子変化が乳頭型のドライバー遺伝子変異としての役割を有することが明らかになった。一方、エナメル上皮腫型では β -catenin 遺伝子の変異が報告され、Wnt 経路のシグナル伝達系が腫瘍化に重要な役割を果たすと考えられている。この2つに遺伝子変化は相互排他的であり、分子マーカーとして診断に有用である。
- (4) 一方、KRAS または BRAF の変異を有する結腸直腸癌細胞では、糖の取り込み、解糖などの糖代謝が亢進しており、膜のグルコーストランスポーターである GLUT-1 の発現がみられることが報告された()。BRAF の変異のある結腸直腸癌では、BRAF の変異がないものに比べて FDG-PET の取り込みが高い。BRAF の変異がある甲状腺乳頭がんでは、GLUT-1 の発現が上昇する。BRAF の変異のある甲状腺分化がんでは、BRAF の変異がないものに比べて FDG-PET の取り込みが高いなど、BRAF 遺伝子の変異がある腫瘍では、糖代謝が亢進していることが指摘されている()(図1)。
- (5) この BRAF 遺伝子の異常を有する腫瘍には BRAF 阻害剤が有効であることが知られている。例えば BRAF 遺伝子の異常を有する悪性黒色腫では、この BRAF 阻害剤が臨床的に有用である。実は、米国にて BRAF 遺伝子の異常を有する頭蓋咽頭腫において、BRAF 阻害剤が腫瘍を縮小したとの症例報告がなされた。
- (6) 我々は、これまでの研究において FDG-PET(^{18}F fluorodeoxyglucose positron emission tomography)を用いた脳腫瘍画像の研究で、乳頭型だけに腫瘍内の糖の代謝が亢進していることを疑っていた()。もし、頭蓋咽頭腫の乳頭型だけに糖代謝の亢進がみられるようであれば、頭蓋咽頭腫の組織学的亜型を、困難な開頭手術を行うことなく FDG-PET 検査を用いて診断、決定できる可能性がある。これにより、手術治療困難な頭蓋咽頭腫の確な薬物治療を行うことが可能となる。そこで我々は、頭蓋咽頭腫における糖代謝に関する研究を行うこととした。

2. 研究の目的

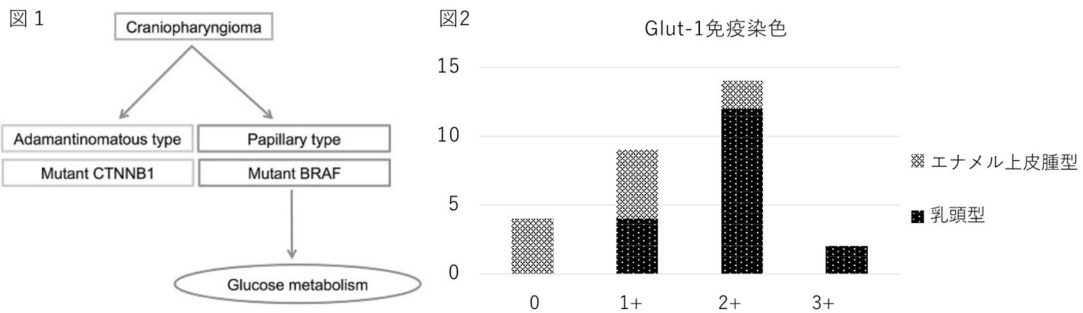
- (1) まず、頭蓋咽頭腫の組織学的亜型、また BRAF 遺伝子の変異について調査する。本研究の目的は、頭蓋咽頭腫の組織学的亜型の内、BRAF 遺伝子の変異を有する乳頭型において、特異的に腫瘍内の糖代謝が亢進しているのか否かについて、調査することである。そして、得られた結果が、FDG-PET 検査における糖の取り込みと一致するか否かについて調査する。
- (2) 以上により、乳頭型頭蓋咽頭腫において、糖代謝が亢進していることを多角的に証明し、分子生物学的所見、FDG-PET 検査などの臨床画像などに一致がみられるか否かを調査することである。

3. 研究の方法

- (1) 2000 年 8 月から 2019 年 3 月の間に群馬大学医学部附属病院で摘出を行った 41 例の頭蓋咽頭腫のうち、頭蓋咽頭腫としての病理組織が少ない症例等は除外し、さらに腫瘍細胞がパラフィン切片で確実に確認できた症例のみを選択した。また、ガンマナイフ治療後の再発症例も、病理組織所見が irregular となる為、これを除外した。最終的に 29 例(エナメル上皮腫型 18 例、乳頭腫型 11 例,年齢中央値 44 歳)を研究対象とした。本研究は群馬大学医学部医学研究院の機関審査委員会により審査・承認された。
- (2) 免疫組織化学的研究：すべての標本は 10%ホルマリンで固定、パラフィンブロックに埋め込まれた。2.5 μm の厚さに切断したパラフィン包埋切片で行った。以下の抗原に対する抗体を使用した：GLUT-1 (monoclonal, 1: 100, Abcam, Cambridge Science Park, Milton, UK)、ヘキソキナーゼ-II (HK-II) (monoclonal, 1: 200, Abcam, Cambridge Science Park, Milton, UK)、BRAF V600E (clone VE1, monoclonal, 1: 50, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA)、およびベータカテニン (monoclonal, 1: 100, BD Transduction Laboratories, Tokyo, Japan)。染色の強度、発現パターン、および陽性細胞の割合を各検体について評価し、GLUT-1 および HK-II 免疫染色の程度を以下の半定量的 4 層スケールを使用して評価した。0: 0%、1+: 0~10%、2+: 11~50%、および 3+: 51~100%。結果に基づいて、症例は陰性 (0 または 1+) または陽性 (2+ または 3+) グループに分類した。
- (3) 手術前の FDG-PET 画像診断は 29 例中 7 例 (24.1%) で実施された。画像所見と最大標準化取込値 (SUVmax) は 7 例で評価された。FDG-PET イメージングは、画像取得は、6 時間以上の絶食後 5~6 MBq / kg の FDG を注射してから 50 分後に開始された。その他の方法については、既に報告されているものと同様である ()。
- (4) グループ間の比較は、マンホイットニー検定を使用した。フィッシャーの直接確率検定は、2x2 の表で使用した。p 値<0.05 を有意差とした。

4. 研究成果

- (1) 免疫組織化学的研究: GLUT-1 の発現レベルは乳頭型でエナメル上皮腫型よりも有意に高かった (エナメル上皮腫型: 0、1 +、2 +、3 + = 2、12、4、0、乳頭型: 0、1 +、2 +、3 + = 0、2、5、4 例、 $p = 0.001$)、ほとんどの乳頭型は陽性グループに分類された (陽性率、エナメル上皮腫で 22.2% [4/18]、乳頭型で 81.8% [9 / 11]; $p = 0.003$ 、フィッシャーの直接確率検定) (図 2)。



- (2) GLUT-1 と同様に、HK-II の発現も乳頭型で顕著であった (0、1 +、2 +、3 + エナメル上皮腫型、7、9、2、0 例、乳頭型で 0、3、3、5 例。 $p = 0.001$) (陽性率、エナメル上皮腫型で 11.1% [2/18]、乳頭型で 72.7% [8/11]; $p = 0.001$)。
- (3) BRAF V600E とベータカテニンの発現パターンは臨床病理学的サブタイプを反映していた (BRAF V600E; 陽性率、エナメル上皮腫型で 0% [0/18]、乳頭型で 90.9% [10/11]、 $p < 0.001$ 、ベータカテニンの核内発現、エナメル上皮腫型で 100% [18/0]、乳頭型で 0% [0/11]、 $p < 0.001$)。
- (4) 手術前の FDG-PET 検査は 2 つのエナメル上皮腫型と 5 つの乳頭型症例で可能であった。個々の SUV-max は、エナメル上皮腫型の場合は 4.1 と 4.2、乳頭型の場合は 9.3、9.4、10.7、15.3、16.1 であった。FDG の取り込みは、SUVmax が 9 を超える 5 つの乳頭型症例すべてで高かった (中央値、10.7; IQR、9.4-15.7)。
- (5) 頭蓋咽頭腫におけるグルコース代謝は、エナメル上皮腫型よりも乳頭型でより強いことが分子生物学的に証明された。FDG-PET イメージングでは、乳頭型症例でのみ、SUVmax が 9 を超える非常に高いグルコース取り込みが示された。乳頭型は、BRAFV600E 変異タンパク質の下流にあるグルコース代謝システムを使用している可能性がある。多くの腫瘍は、BRAFV600E 変異タンパク質の下流にあるグルコース代謝システムを利用している。ヒトの癌細胞株では、GLUT1 の発現とグルコースの取り込みの増加は KRAS または BRAF の変異に依存していた。BRAF 変異から細胞のグルコース代謝をアップレギュレートするまでのメカニズムは完全には理解されていないが、BRAF の下流である ERK (Extracellular Signal-

regulated Kinase; 細胞外シグナル制御キナーゼ) は GLUT1 の発現を制御する複数の転写因子を調節している。

- (6) グルコース代謝の評価は FDG-PET を行うことにより実際の症例において検査することが可能である。FDG-PET における糖代謝の亢進を、BRAF 変異と結びつける研究は、他の癌腫においても行われている。FDG-PET は、野生型の結腸直腸癌および分化型甲状腺癌よりも変異 BRAF で高い SUVmax を示す。BRAF 阻害剤 (ベムラフェニブ) の治療効果は、BRAF 変異メラノーマにおける FDG-PET SUVmax によって評価が可能である。
- (7) 頭蓋咽頭腫は摘出術、生検術が非常に難しい頭蓋底に存在する腫瘍である。腫瘍の組織所見をうるだけでも、大きなリスクを伴う。もし、頭蓋咽頭腫の組織亜型、遺伝子型で決めることができる場合、いわゆる頭蓋咽頭腫における radiomics としての役割を FDG-PET が果たす可能性がある。
- (8) 例えば、手術前に FDG-PET 検査で、乳頭型の頭蓋咽頭腫であることを確認。術前に BRAF 阻害剤を投与する。これにより腫瘍の消失が得られれば手術を行わない場合の有用な代替治療になりうる。また、腫瘍が消失しない場合も縮小が得られることで、手術が容易となる効果が得られる。いわゆる術前補助化学療法、ネオアジュバント化学療法を行うことが可能になる可能性がある。米国では既に BRAF 阻害剤の頭蓋咽頭腫への臨床応用が検討されている。日本でもこの治療が現実のものになった場合には、この糖代謝を指標とした radiomics は適切な化学療法の為に有用な、新しい診断技術となると思われる。
- (9) 以上の成果は、2021 年、Scientific report 誌に掲載された ()。

文献

- Yun, J., Rago C., Cheong I., Pagliarini R., Angenendt P., et al. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* 325, 2009, 1555-1559
- Mukada N., Tosaka M., Matsumura N., Yamaguchi R., Aihara M., et al. Subtype-dependent difference of glucose transporter 1 and hexokinase II expression in craniopharyngioma: an immunohistochemical study. *Sci Rep* 08;11, 2021, 126
- Tosaka M., Higuchi T., Horiguchi K., Osawa T., Arisaka Y., et al. Preoperative Evaluation of Sellar and Parasellar Macro-lesions by Fluorine-18 Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. *World Neurosurg* 103, 2017, 591-599

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mukada Naoto, Tosaka Masahiko, Matsumura Nozomi, Yamaguchi Rei, Aihara Masanori, Isoda Koji, Higuchi Tetsuya, Tsushima Yoshito, Yokoo Hideaki, Yoshimoto Yuhei	4. 巻 11
2. 論文標題 Subtype-dependent difference of glucose transporter 1 and hexokinase II expression in craniopharyngioma: an immunohistochemical study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80259-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato Koichi, Toba Ayaka, Mogi Chihiro, Toba Masayuki, Yamane Nobuhiro, Tosaka Masahiko, Tomura Hideaki, Im Dong-Soon, Okajima Fumikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 The protective role of proton-sensing TDAG8 in the brain injury in a mouse ischemia reperfusion model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74372-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Rei, Tosaka Masahiko, Miyagishima Takaaki, Osawa Tadashi, Horiguchi Keishi, Honda Fumiaki, Yoshimoto Yuhei	4. 巻 134
2. 論文標題 Sagittal bending of the optic nerve at the entrance from the intracranial to the optic canal and ipsilateral visual acuity in patients with sellar and suprasellar lesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 180 ~ 188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2019.9.JNS191365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyagishima T, Tosaka M, Yamaguchi R, Nagaki T, Ishii N, Kojima T, and Yoshimoto Y.	4. 巻 161
2. 論文標題 Extended endoscopic endonasal resection of craniopharyngioma using intraoperative visual evoked potential monitoring: technical note.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neurochir (Wien)	6. 最初と最後の頁 2277-2284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00701-019-04028-7. Epub 2019 Aug 12.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tosaka M, Shimizu T, Miyagishima T, Tanaka Y, Osawa T, Aihara M, Yamaguchi R, Yoshimoto Y.	4. 巻 161
2. 論文標題 Combined Supra-Infrasellar Approach to Pituitary Macroadenoma With Oculomotor Cistern Extension: Surgical Strategy and Experience	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neurochir (Wien)	6. 最初と最後の頁 1025-1031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00701-019-03869-6. Epub 2019 Mar 12.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tosaka M, Yamaguchi R, Aihara M, Miyagishima T, Yoshimoto Y.
2. 発表標題 Surgical strategy using extended endoscopic transsphenoidal approach for craniopharyngioma: single center experience
3. 学会等名 NASBS Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tosaka M, Yamaguchi R, Aihara M, Miyagishima T, Yoshimoto Y.
2. 発表標題 Surgical strategy using extended endoscopic transsphenoidal approach for craniopharyngioma: single center experience
3. 学会等名 15th Asian-Oceanian International Congress on Skull Base Surgery (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 登坂 雅彦, 山口 玲, 藍原 正憲, 宮城島 孝昭, 向田 直人, 好本 裕平
2. 発表標題 内視鏡下拡大蝶形骨洞腫瘍摘出術における大腿筋膜によるパッチワーク縫合を用いた頭蓋底再建
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 登坂 雅彦
2. 発表標題 成長ホルモン産生下垂体腺腫の外科治療
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 登坂雅彦（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 2
3. 書名 内分泌画像検査マニュアル第2版	

1. 著者名 登坂雅彦（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 2
3. 書名 下垂体疾患診療マニュアル第3版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	向田 直人 (Mukada Naoto)	群馬大学・脳神経外科・大学院 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------